

Aus dem physikalisch-chemischen Laboratorium der Sandoz A.G., Basel

Untersuchungen
über das physikalisch-chemische Verhalten
der Lipoproteide humaner Seren

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät der Universität Basel

Vorgelegt von
VICTOR BALTZER
von Basel

1958

Basel 1959
Druck von Benno Schwabe & Co. Basel



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546712_0093

Aus dem physikalisch-chemischen Laboratorium der Sandoz A.G., Basel

Untersuchungen über das physikalisch-chemische Verhalten der Lipoproteide humaner Seren

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät der Universität Basel

Vorgelegt von
VICTOR BALTZER
von Basel



Basel 1959
Druck von Benno Schwabe & Co. Basel

Von der Medizinischen Fakultät genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. med. A. Gigon

Tag der Promotion: 5. Dezember 1958

Erschienen im
«Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften»
Vol. 15 (1959), Fasc. 2/3

Das große Interesse, das den Lipoproteiden heute entgegengebracht wird, beruht vor allem auf den Untersuchungen *Gofmans* über die Atherosklerose. Nach der von *Gofman* eingeführten Flotationstechnik sind im Verlauf der letzten Jahre durch ihn selbst und durch zahlreiche andere Autoren die Lipoproteide tausender menschlicher Seren in der Ultrazentrifuge analysiert worden. Zudem wurden auch wichtige physikalische und chemische Aufschlüsse über diese Serumbestandteile gewonnen.

Die vorliegende Arbeit gibt zunächst einen kurzen Überblick über wichtige Ergebnisse der Lipoproteidforschung unter spezieller Berücksichtigung der *Gofmanschen* Untersuchungstechnik.

Davon ausgehend wird eine eigene, kleine Versuchsreihe beschrieben, in der die *Gofmanschen* Ergebnisse an einer Reihe von Lipoproteiden verifiziert und unter Variation der Untersuchungstechnik überprüft und erweitert werden sollten.

Die Untersuchung der Serumlipoproteide nach Gofman

Prinzip: *Gofman* verwendet zur Isolierung und Charakterisierung der Lipoproteide (LP) starke künstliche Gravitationsfelder, wie sie mit sehr schnell umlaufenden Zentrifugen erzeugt werden können. Im speziellen benützt er die Ultrazentrifuge (UZ) für die Messung der Konzentrationen und Flotationskonstanten dieser Serumfraktion. Die quantitative Abtrennung der LP von den übrigen Serumeiweißen erfolgt vorgängig durch Flotation oder Aufräumung unter Sedimentation der restlichen Proteine.

Historisches: Die Anwendung starker Zentrifugalfelder zur Trennung von Gemischen hochmolekularer Substanzen wurde durch *Svedberg* (72) eingeführt. Derselbe Forscher konstruierte auch die ersten Zentrifugen mit Einrichtungen zur optischen Messung des Sedimentationsvorganges für analytische Zwecke und gab die Berechnungsformeln dafür an. Das neue Meßinstrument, die Ultrazentrifuge, wurde in der Folge von

Svedberg und anderen Autoren zur Erforschung der Plasmaeiweiße herangezogen.

Gewisse, schon 1935 von *McFarlane* (52) beobachtete Unregelmäßigkeiten, die bei Untersuchungen konzentrierter Seren im Bereich der Albumin- und sogenannten X-Komponenten auftraten, konnte *Pedersen* (59, 60) an Hand systematischer Reihenversuche auf das niedere spezifische Gewicht der letzteren Komponenten zurückführen. Ihm gelang es auch bereits, die X-Fraktion in Flotationsversuchen durch präparative Zentrifugierung abzutrennen, indem er durch Salzzusatz den niedermolekularen Anteil der Serumlösung, für die wir auch die Bezeichnung Milieu oder Medium verwenden, auf 1,04 erhöhte. Die Tatsache, daß das von *Blix*, *Tiselius* und *Svensson* (5) durch präparative Elektrophorese gewonnene β -Globulin sich in der UZ ähnlich wie die X-Komponente verhält, sowie die Ergebnisse chemischer Analysen ließen *Pedersen* die Lipoproteidnatur der X-Komponente erkennen. Von ihm rührt auch deren Benennung als β -Lipoglobulin und β -Lipoproteid her. Damals wurden diese Lipoproteide als sehr unbeständige Körper aufgefaßt, die sich in Abhängigkeit der Serumkonzentration aus dem Albumin und den Globulinen bilden sollten.

Gofman, *Lindgren* und *Elliott* (24, 49) griffen 1949 in ihren ersten Publikationen über die LP die Untersuchungen von *McFarlane* und *Pedersen* wieder auf und führten mit der Ultrazentrifuge die ersten analytischen Flotationsmessungen an dieser Serumkomponente durch. Wurde die Milieudichte des Serums durch Salzzusatz genügend erhöht, so entstand im UZ-Diagramm zusätzlich zu den Eiweißsedimentationsgradienten ein sich entgegengesetzt bewegendes Flotationsgradient. Die Konzentration der so erfaßten LP wurde mit ca. 5% des Gesamtproteins angegeben. Es konnte auch der Nachweis erbracht werden, daß die LP sich nicht einfach aus Albumin und Globulin aufbauen, sondern eine gewisse Beständigkeit haben müssen (19).

Auf Grund der Ergebnisse dieser Vorversuche und anderer sehr ausgedehnter Versuchsreihen arbeiteten *Gofman* und Mitarbeiter in der Folge eine Methode aus, die es ermöglicht, nicht nur die X-Komponente = LP niederer Dichte zu erfassen, sondern auch jene LP, deren spezifisches Gewicht infolge ihres geringen Lipoidgehaltes etwas höher liegt. Diese LP erscheinen im Elektrophoresediagramm in der α -Globulinfraktion und werden als LP hoher Dichte bezeichnet (11, 10).

Die Gofmansche Methode: Grundsätzlich erfolgt eine LP-Analyse nach *Gofman* in zwei Schritten (77, 11). Der erste Schritt dient der präparativen Trennung und Anreicherung der LP innerhalb des gewünschten Dichtebereiches. Er erfordert:

1. Die Erhöhung der Milieudichte des Serums,
2. die Zentrifugierung in einer hochtourigen Winkelzentrifuge,
3. die sorgfältige Abschöpfung des aufgerahmten Materials.

Der zweite Schritt umfaßt die analytische Untersuchung in der UZ. Dabei wird das präparativ gewonnene Material ohne weitere Behandlung erneut flotiert und die erfolgende Auftrennung photographisch festgehalten. Hierauf folgt die Analyse des Diagramms.

Für eine Analyse des gesamten LP-Spektrums, welches sowohl die LP niederer Dichte als auch jene hoher Dichte umfaßt, werden 25 cm³ Blut auf bekannte Weise zu Serum verarbeitet, das dann wie folgt verwendet wird.

Die Analyse der Lipoproteide niederer Dichte

5 cm³ Serum werden mit 4 cm³ einer wässrigen NaCl-Lösung der Dichte 1,1315 versetzt. Das Milieu der Serumlösung erhält dadurch die Dichte von 1,063 bei 26° C. Diese Serumlösung wird dann bei 14–21° C während 13–16 Std. bei 30 000 U/Min. = 79 420 g zentrifugiert. Dabei flotieren die LP niederer Dichte, während die übrigen Proteine einschließlich der LP hoher Dichte sedimentieren. Die LP niederer Dichte werden diesem Versuch in 5facher Konzentration (bezogen auf ihre Ausgangskonzentration im Serum) entnommen und anschließend in der Ultrazentrifuge bei 52 640 U/Min. = 215 000 g untersucht. Man erhält im Diagramm entweder eine mehr oder weniger große Anzahl Gipfel oder aber sogenannte Bänder, die man sich aus einer großen Zahl engbenachbarter Gradienten zusammengesetzt vorzustellen hat. Das Diagramm wird zufolge des hohen Salzgehaltes der Lösung von einem sich allmählich einstellenden Gleichgewichtsgradienten der Salze überlagert, welcher als Basis des Diagramms aufzufassen ist und deshalb spezielle Referenzversuche mit der entsprechenden Salzlösung erfordert.

Die Auswertung der Diagramme nach *Gofman* erfolgt mit dem Ziel einer Definition und quantitativen Bestimmung der Lipoproteide.

Der Sedimentationskonstante, ausgedrückt in Svedberg-Einheiten = s-Einheiten ($1\text{ s} = 10^{-13}\text{ cm/Sek./dyn/g}$) entspricht in Flotationsversuchen die Flotationskonstante, welche üblicherweise statt in Svedberg-Einheiten mit negativem Vorzeichen $-s$ durch das Symbol s_f ausgedrückt wird. *Gofman* charakterisiert die LP niederer Dichte nicht analog dem Vorgang von *Svedberg*, sondern bestimmt die LP innerhalb gewisser, willkürlich festgelegter Flotationszonen. Solche Zonen werden bei *Gofman* durch Flotationslinien (s_f -Linien) begrenzt, welche theoretisch auf dem Diagramm die gleiche Lage haben, wie sie die schnellsten und langsamsten LP-Partikel des gewählten Bereiches auf Grund ihrer Flotationskonstan-

ten einnehmen müßten. Es wird also nicht, wie üblich, die Flotationskonstante einer Partikelart aus ihrer Flotationsgeschwindigkeit berechnet, sondern umgekehrt die Lage bestimmt, welche eine Partikelart von vorgegebener Flotationskonstante auf Grund ihrer Flotationsgeschwindigkeit zu einer bestimmten Zeit auf dem Diagramm einnehmen müßte. Anfänglich wurde bei der Positionsberechnung der s_f -Linien nur die temperaturbedingte Viskositätsänderung des Untersuchungsmaterials berücksichtigt. Von 1952 an führte *Gofman* weitere Korrekturfaktoren ein und bestimmte in der Folge die Lage der s_f -Linien erstens in Abhängigkeit der LP-Konzentration innerhalb der durch sie begrenzten Zone (self-slowng effect) und zweitens unter Berücksichtigung des *Johnston-Ogston-Phänomens* (37). Flotationsbereichswerte, welche unter Berücksichtigung des «self-slowng»-Effektes bestimmt wurden, erhalten nach *Gofman* die Bezeichnung Standardflotationswerte s_f^0 . In dieser Arbeit wird diese Art der Bezeichnung übernommen.

Die Konzentration der LP einer Flotationszone wird als Absolutwert in mg %/cm³ Serum angegeben. Ihre Bestimmung erfordert zunächst die Planimetrierung der Fläche, welche durch die LP-Gradienten, die beiden Flotationsgrenzlinien und die gekrümmte Basislinie eingeschlossen wird. Die Umrechnung des Flächenwertes in mg % erfolgt unter Berücksichtigung des spezifischen Brechungsinkrementes, der optischen und zeichnerischen Vergrößerungsfaktoren und des Konzentrationszuwachses der LP durch die präparative Stufe. Schließlich wird die Konzentrationsänderung, die infolge des sektorförmigen Baues der Zelle auftritt, als Korrekturfaktor berücksichtigt.

Die Analyse der Lipoproteide hoher Dichte

2mal 3 cm³ Serum werden in zwei Versuchen zur Untersuchung der LP hoher Dichte verwendet.

In einem ersten Versuch werden 3 cm³ Serum mit 3 cm³ einer NaNO₃-Lösung in D₂O der Dichte 1,2427 vermischt, so daß die Milieudichte 1,125 bei 26° C beträgt. Die Lösung wird dann bei 14–21° C während 23–26 Std. bei 40 000 U/Min. = 114 400 g zentrifugiert. Neben den rasch aufsteigenden LP niederer Dichte flotieren zwei LP hoher Dichte. Das LP-Gemisch wird diesem Versuch in 3facher Konzentration entnommen und in der UZ bei 52 640 U/Min. = 215 000 g untersucht. Hierbei erhält man im Diagramm, von den rasch flotierenden LP niederer Dichte abgesehen, 2 Gipfel von LP hoher Dichte, die mit HDL₁ und HDL₂ bezeichnet werden.

In einem zweiten Versuch werden weitere 3 cm³ Serum mit 3 cm³ einer NaNO₃-Lösung in D₂O der Dichte 1,3927 vermischt. Die Milieudichte

beträgt dann 1,20 bei 26° C. Diese Lösung wird dann bei 14–21° C während 23–26 Std. bei 40 000 U/Min. = 114 400 g zentrifugiert. Es flotieren in diesem Falle neben den rasch aufsteigenden LP niederer Dichte *drei* LP hoher Dichte. Das Gemisch der LP wird diesem Versuch in 3facher Konzentration entnommen und in der UZ bei 52 640 U/Min. = 215 000 g untersucht. Im Diagramm erscheinen neben der Komponente HDL₁ die beiden LP hoher Dichte HDL₂ und HDL₃ in einem zusammenhängenden Doppelgradienten.

Die Flotationskonstanten der HDL₁–HDL₃ sind von *Gofman* nicht mitgeteilt worden.

Die Konzentrationsbestimmung der LP hoher Dichte erfolgt grundsätzlich gleich wie jene der LP niederer Dichte. Da aber hier gut ausgeprägte Gradienten vorhanden sind, kann deren Fläche direkt planimetriert und umgerechnet werden. Selbstverständlich muß die Basislinie auch hier durch spezielle Referenzversuche mit den entsprechenden Salzlösungen bestimmt werden.

Modifikationen der Gofmanschen Ultrazentrifugentechnik

Lewis und *Page* (29, 48, 47) untersuchten die LP niederer Dichte nicht bei einer Milieudichte von 1,063, sondern gemeinsam mit den LP hoher Dichte bei einer solchen von 1,21. Die präparative Zentrifugierung bei 63 000 g während 13 Std. ist nach Auffassung von *De Lalla* et al. (10) für die quantitative Erfassung der LP hoher Dichte oder α -LP ungenügend.

Jahnke (35) berichtet über Flotationsversuche der LP niederer Dichte ohne vorhergehende präparative Stufe. Das Serum wird direkt in der analytischen UZ untersucht, nachdem seine Milieudichte durch Zusatz von 10 % NaCl erhöht wurde. Die so erhaltenen Diagramme sollen gegenüber jenen, welche nach der Gofmanschen Methode erhalten werden, unter Umständen sogar mehr Komponenten und eine andere Aufteilung der LP zeigen. Die direkte analytische Ultrazentrifugierung unter Umgehung der präparativen Stufe ist sehr bestechend, nicht nur weil sie einfacher und zeitsparender wäre, sondern weil die sehr labilen LP in einem Milieu gehalten werden könnten, das sich vom natürlichen Serummilieu nur durch einen relativ hohen Salzgehalt unterscheidet. Sehr störend wirken sich aber die am Meniskus entstehenden und den Flotationsgradienten entgegenwandernden Sedimentationsgradienten der Serumeiweiß-Komponenten und deren Konzentrationsanstieg gegen den Boden der Zelle zu aus. Bei der Beurteilung der Flotationskonstanten oder von Flotationskonstantenbereichen müßten, namentlich wenn Vergleiche mit anderen Methoden angestellt werden, neben dem Selbstver-

langsamungseffekt und dem Johnston-Ogston-Phänomen auch die Einwirkungen der hohen Milieuviskosität und der entgegengesetzt wandernden Eiweißpartikel berücksichtigt werden.

Die Auftrennung der Lipoproteide niederer Dichte durch mehrstufige präparative Zentrifugierung

1951 beschrieben *Lindgren et al.* (50) eine Methode, die es gestattet, aus dem weiten Dichtebereich der LP niederer Dichte engere Bereiche und sogar einzelne Komponenten zu isolieren. Die Isolierung der gewünschten Fraktion erfolgt auch durch präparatives Zentrifugieren, erfordert aber, um die Substanz genügend rein zu erhalten, mehrere sukzessive präparierte Stufen.

Für die Darstellung von Fraktionen, deren Dichtewerte zwischen 1,05 und 1,006 liegen, findet das sogenannte Differentialdichtentrennverfahren Anwendung, in welchem die LP der gewünschten Dichte durch zwei aufeinanderfolgende präparative Stufen in Medien verschiedener Dichte vom übrigen Material getrennt werden.

Das Differentialdichtentrennverfahren kommt für die Auftrennung der LP, deren spezifisches Gewicht unterhalb 1,006 liegt, sowie der Chylomikronen deshalb nicht in Frage, weil die Milieudichte nicht tiefer eingestellt werden kann. Es gelingt aber auch hier, durch Variation der Zentrifugierungszeit und des Schwerfeldes, schneller und langsamer flotierenden Material zu trennen.

Jones et al. (39) isolierten durch mehrstufige präparative Zentrifugierung im Bereich der relativ langsam flotierenden LP s_f 2–17 etwa 7 im UZ-Diagramm homogen erscheinende Komponenten. Aus den LP von s_f 17–40 000 ließen sich nur noch Komponentengruppen darstellen, in deren Bereich die Dichteunterschiede der LP so gering sind, daß eine weitere Aufteilung in homogene Komponenten nicht mehr in Frage kommt.

Die mehrstufige präparative Auftrennung der LP im starken Gravitationsfeld findet entweder vorgängig einer Analyse in der UZ oder einer der zahlreichen anderen Untersuchungen statt und ermöglicht die Definierung chemischer, struktureller und immunologischer Unterschiede nicht nur zwischen den α - und β -LP bzw. LP hoher und niederer Dichte, sondern auch zwischen den LP-Arten im Bereich der LP niederer Dichte (2, 17, 32, 38, 46, 53).

Es sei hier noch auf eine interessante Modifikation von *Oncley und Mannick* (57) hingewiesen. Diese Autoren verwenden zur Auftrennung der LP im starken Gravitationsfeld das Dichtegradientenrohr. Der Hauptvorteil dieses Verfahrens soll in der Möglichkeit bestehen, mehrere

Dichteklassen der LP in einem einzigen Lauf präparativ zu isolieren und damit weiteren Untersuchungen zugänglich zu machen.

Andere Untersuchungsmethoden der Lipoproteide

Die ersten Darstellungen von LP-Präparaten konstanter Bruttozusammensetzung gelangen *Machebœuf* 1929 (51) und *Adair* und *Adair* 1935 (1) mit Hilfe von Aussalzungsverfahren.

Die *Cohnschen* Fraktionierungsverfahren (9, 8) erlauben, die α - und β -LP in zwei getrennten Fraktionen anzureichern. Diese ursprünglich nur für Fraktionierungen großer Serumpools geeignete Methode wurde von *Cohn* et al. (8) sowie *Lever* et al. (43) für Untersuchungen einzelner Serumproben angepaßt. Um die LP in hochgereinigter Form zu erhalten, ist jedoch eine zusätzlich präparative Flotation in starkem Zentrifugalfeld erforderlich (56, 55). Die Konzentrationen der α - und β -LP können aus den Lipidanalysen errechnet werden.

Auch *Russ*, *Eder* et al. verwenden diese Technik der Mikrofraktionierung (66, 4) in jüngerer Zeit in Kombination mit präparativer Zentrifugierung im starken Zentrifugalfeld und weiterer Auftrennung der LP-Konzentrate im Dichtegradientenrohr (13).

Die freie Elektrophorese als präparative oder analytische Methode ist zum Studium der LP von beschränkter Bedeutung. Die LP erscheinen im EL-Diagramm normalerweise nicht als selbständige Komponenten (5, 15, 33, 45). Immerhin stellten *Lever* et al. interessante Veränderungen der EL-Diagramme bei Patienten mit idiopathischer Hyperlipämie und primär hypercholesterinämischer Xanthomatose nach vorgängiger Heparininjektion fest (33, 45). Diese Veränderungen sind offenbar auf Ladungserhöhungen der α - und β -LP zurückzuführen.

Die Elektrophorese auf festen Medien (75, 36, 12, 68, 40, 7, 33, 41), namentlich die Filterpapierelektrophorese, wird sehr häufig angewendet. Die LP lassen sich in eine α - und β -Komponente sowie in einen Anteil, der keine oder nur eine sehr geringe Motilität aufweist, auftrennen. Die Lipide werden nach erfolgter Auftrennung in der Regel angefärbt, können aber auch eluiert und chemisch analysiert werden (7, 41, 75). Die Filterpapierelektrophorese ist als quantitative Bestimmungsmethode unsicher, eignet sich aber für die Auswertung in Relativwerten.

Eine Relation zwischen Papierelektrophorese und UZ-Flotationsdiagrammen ist in neuerer Zeit von *Smith* (68) aufgestellt worden. Es wird im Papierelektrophoresediagramm eine sogenannte Prä- β -Lipidkomponente beschrieben, welche bei Patienten nach überstandnem Herzinfarkt deutlich vermehrt ist. Diese Prä- β -Lipidkomponente soll den s_f 18–90 LP in UZ-Versuchen bei der Milieudichte 1,063 entsprechen.

Spezielle Bestimmungsmethoden für die Chylomikronen sind die Dunkelfeldauszählung und die Trübungsmessung des Serums.

Die Bedeutung der verschiedenen Lipoprotein-Auftrennungsv erfahren

Im Gegensatz zu den anderen Serumproteinen erweisen sich für die Auftrennung der LP nicht ihre Löslichkeit und elektrische Ladung, sondern ihre Dichten und Teilchengewichte als die geeignetsten Kriterien. Für die LP hoher Dichte werden die Teilchengewichte mit 165 000 bis 435 000, für die Folge der LP niederer Dichte und Chylomikronen solche von 2 100 000 bis 250 Millionen angegeben (*B. Shore* zit. nach *Eder* [14]). Die Dichtewerte der LP hoher Dichte sind für HDL₂ und HDL₃ 1,075 bzw. 1,145 (HDL₄ dürfte das dichteste der LP niederer Dichte sein, das nur unter speziellen experimentellen Bedingungen einzeln erfaßt werden kann). Für die LP niederer Dichte und Chylomikronen wird der Dichtebereich von 1,050 bis unter 0,99 angegeben (39).

Der außerordentlich große Flotationskonstantenbereich der LP ist offenbar dadurch gegeben, daß mit zunehmendem Teilchengewicht bei Flotationsversuchen auch die Differenz der Milieudichte zur Teilchendichte größer wird.

Die Übereinstimmung der nach verschiedenen Methoden darstellbaren LP-Fractionen ist noch nicht in allen Teilen gesichert. Die LP hoher Dichte reichern sich in Fraktion IV-1 bei Anwendung der Methode 10 nach *Cohn* an und entsprechen den α -LP bei freier oder Papierelektrophorese. In der Fraktion III-0 sind die LP niederer Dichte enthalten, welche in der Elektrophorese β -Mobilität aufweisen. Die Chylomikronen (75) finden sich in Fraktion I+II+III (*Cohn*: Methode 10). Ihre Laufgeschwindigkeit ist im elektrischen Feld uneinheitlich (43).

Die Chylomikronen lassen sich von den LP nicht scharf abgrenzen.

Der Anteil der LP wird auf Grund der Resultate verschiedener Bestimmungsmethoden mit etwas mehr als 10% des Serumeiweißes angegeben. 30–40% entfallen dabei auf die LP hoher Dichte, etwa 40% auf die LP im Dichtebereich 1,019–1,063, der Rest auf solche mit geringerer Dichte (14).

Ergebnisse früherer Arbeiten

Die große Mehrzahl sämtlicher bisher im starken Gravitationsfeld durchgeführter Lipoproteinuntersuchungen befaßt sich mit der Erforschung der LP niederer Dichte im Zusammenhang mit der Atherosklerose. Als Ausgangspunkt sind die von *Gofman* et al. (23, 25, 19) an cholesteringefütterten Kaninchen durchgeführten Experimente anzusehen, welche zeigten, daß nach einer Latenzzeit von 30–40 Tagen im Serum jener Tiere, die eine ausgesprochene Atherosklerose entwickelt hatten,

hohe Konzentrationen der LP s_f 10–30 nachweisbar waren, während die Seren der Tiere ohne Atherosklerose und der Kontrollgruppen nur die normalerweise vorhandenen LP s_f 5–8 enthielten.

Die Ergebnisse dieser Tierversuche versprachen, falls sie sich auch am Menschen reproduzieren lassen sollten, wesentliche und neue Gesichtspunkte für die Atheroskleroseforschung zu liefern. Vor allem interessierte es, ob diese Makromoleküle als ätiologischer Faktor für die Coronarsklerose in Betracht zu ziehen seien, und ob solche LP-Analysen für die Klinik von größerem diagnostischem und prognostischem Werte als Cholesterinbestimmungen seien.

Für diese Untersuchungen wurde aus dem Spektrum der LP niederer Dichte, deren Flotationskonstantenbereich sich bis zu den Chylomikronen, also von s_f 2 bis s_f 40 000 erstreckt (39), zunächst nur die s_f 10–20-Klasse beurteilt. Diese LP-Klasse wird durch alimentäre Hyperlipämie nicht nachweisbar beeinflusst. Die Untersuchung an humanen Seren (23, 25) zeigte zunächst, daß einerseits die LP mit Flotationskonstanten über 10 auch bei Individuen ohne manifeste Form von Atherosklerose, selbst in jungen Altersklassen, auftraten und ihre Häufigkeit und Konzentration alters- und geschlechtsabhängig waren. Bei jugendlichen weiblichen Personen waren diese LP durchschnittlich seltener oder in geringerer Konzentration vorhanden als bei den entsprechenden männlichen Individuen. Mit zunehmendem Alter sind sie durchschnittlich häufiger und in höheren Konzentrationen nachweisbar, wobei der Einfluß des Geschlechtes zurücktritt oder sich umgekehrt auswirkt.

Ferner zeigte es sich, daß bei beiden Geschlechtern und Altersklassen, sowohl in Normalseren, als in solchen, die auf Grund klinischer Untersuchungen von Atherosklerosefällen stammten, die s_f 10–20-LP in allen Konzentrationen von 0 bis etwa 120 mg% anzutreffen waren und, was besonders bedeutsam ist, in allen diesen Gruppen auch Fälle ohne nachweisbare s_f 10–20-LP vorkamen.

Aus den Tabellen, welche die Konzentrationswerte der s_f 10–20-LP aller untersuchten Seren detailliert enthalten, ist ersichtlich, daß in der überwiegenden Zahl der Normalfälle die s_f 10–20-LP entweder nicht nachweisbar sind oder innerhalb des Konzentrationsbereiches von 0 bis 40 mg% liegen. Höhere Konzentrationen werden seltener angetroffen. In der Gruppe der Fälle mit Herzinfarkt und anderer mit Atherosklerose in Verbindung stehender Erkrankungen, z. B. Diabetes mellitus, sind Seren ohne nachweisbaren s_f 10–20-LP-Gehalt viel seltener. Die Mehrzahl dieser Seren weist aber ebenfalls s_f 10–20-LP-Konzentrationen im Bereich von 0–40 mg% auf, neben denen höhere Konzentrationen häufiger meßbar sind. Parallel durchgeführte Gesamtcholesterinbestim-

mungen zeigten eine nur schwache Korrelation zu den s_f 10-20-LP-Bestimmungen.

Aus diesen anfänglichen Ergebnissen ging hervor, daß zwischen dem LP-Metabolismus und der Atherosklerose ein Zusammenhang besteht, daß aber die Erstellung einer Korrelation zwischen den LP-Konzentrationen der verschiedenen Klassen und den atherosklerotischen Erkrankungsformen und damit auch dem prognostischen Wert der LP-Analysen in der Klinik die statistische Auswertung der Ergebnisse größerer Versuchsserien erforderte.

In den folgenden Jahren verfeinerten *Gofman* u. Mitarb. die Flotationstechnik und die Methode der Diagrammauswertungen. Diese von *De Lalla* et al. (11) beschriebene Technik ist eingangs dieser Arbeit kurz zusammengefaßt worden. An Stelle der s_f 10-20-LP wurden aus technischen Gründen die s_f^0 12-20-LP beurteilt; zugleich wurden aber auch höhere Flotationsbereiche bis s_f^0 400 in die Untersuchungen einbezogen. Dabei wurde festgestellt, daß den einzelnen LP-Klassen eine unterschiedliche Bedeutung für die Genese der Atherosklerose zukommen muß.

Diese Erkenntnis fand ihren Niederschlag in der Berechnung des sogenannten Atherogenic Index, AI (27).

Der AI bringt dadurch einen größeren Bereich des Flotationsdiagrammes der LP in Korrelation zur Atherosklerose, daß die Konzentrationen der ausgewählten LP-Klassen, entsprechend ihrer relativen Bedeutung für die Entstehung der Atherosklerose, berücksichtigt werden. So wird den s_f^0 12-400-LP eine 1,75mal größere Bedeutung für die Atherosklroseentstehung als den s_f^0 0-11-LP beigemessen. Die Formel zur Berechnung des AI lautet:

$$AI = a (s_f^0 \text{ 0-11 LP-Konz.}) + b (s_f^0 \text{ 12-400 LP-Konz.}),$$

wobei $a = 1$ und $b = 1,75$ ist

Diesen AI-Werten wird im Vergleich mit den Konzentrationswerten der LP innerhalb einzelner Flotationsbereiche eine höhere Selektivität bei der Ermittlung der Fälle, die eine Tendenz zu Coronargefäßerkrankungen aufweisen, zugeschrieben.

Eine noch bessere Selektion soll sich durch zusätzliches Einbeziehen des diastolischen Blutdruckes erzielen lassen (76, 20).

Lawry et al. (42) andererseits erachten die Grundlagen des AI für mathematisch unrichtig und lehnen deshalb seine Anwendung ab.

1954 publizierten *Glazier* et al. (18) die Ergebnisse der LP-Konzentrationsbestimmungen in 2105 normalen humanen Seren. Die mitgeteilten Konzentrationen beziehen sich auf 4 LP-Klassen innerhalb des Bereiches s_f^0 0-400, stellen Durchschnittswerte der nach Geschlecht gesonderten Altersklassen dar und liegen innerhalb der folgenden Grenzwerte:

s_f^0	0-12	12-20	20-100	100-400
mg%	263,9-369,2	36,5-102,1	66,5-131,5	24,2-82,9

Die LP- und Cholesterinbestimmungen *Gofmans* und seiner Mitarbeiter sowie anderer Autoren, obwohl in der Hauptsache auf das Studium der Herzkranzgefäßerkrankungen ausgerichtet, wurden aber auch bei verschiedenen anderen Krankheiten durchgeführt.

Bei chronischer Hepatitis wurden normale Konzentrationen der LP der s_f 10-20-Klasse festgestellt, doch sollen während der aktiven Phase der akuten Hepatitis höhere s_f 10-20-LP-Konzentrationswerte gemessen werden (63). Fettsucht ist stärker mit einer erhöhten Konzentration der LP der s_f 35-100-Klasse als mit jener der LP der s_f 12-20-Klasse korreliert (21). Die Seren von Nephrosefällen weisen extrem hohe LP-Konzentrationen auf.

Quantitative Bestimmungen der LP-Klassen s_f^0 0-12, s_f^0 12-20, s_f^0 20 bis 100 und s_f^0 100-400 wurden auch bei Xanthoma tendinosum, Xanthoma tuberosum, Xanthelasma, dem nephrotischen Syndrom, Gallenstauung, Myxödem und essentieller Hyperlipämie durchgeführt (26). Typisch für diese Krankheitsbilder ist, daß sie sich durch ihre LP-Diagramme charakterisieren lassen, indem die abnormen LP-Konzentrationen sehr ausgeprägt sind und sich auf einzelne Flotationsbereiche beziehen. In den Fällen von Gallenstauung sind die LP zudem in ihrer chemischen Zusammensetzung verändert (13, 67).

Verschiedene Untersuchungen befassen sich mit der Beeinflußbarkeit der LP-Klassen.

Fett- und cholesterinarme Diät senkt die Konzentration der LP s_f 12-20 (22). Eine Nahrung mit hohem Anteil an tierischem Fett bewirkt eine deutliche Erhöhung der s_f^0 0-12 und s_f^0 12-20-LP-Konzentrationswerte, während eine solche mit hohem Pflanzenfettgehalt keine Vermehrung der LP zur Folge haben soll. Kohlenhydratreiche Diät wirkt sich in der Erhöhung der s_f^0 20-100 und s_f^0 100-400 -LP-Konzentrationen aus (54). Fasten ist mit einem allgemeinen Konzentrationsanstieg der LP niederer Dichte verbunden (18, 65, 3).

Heparininjektionen bewirken in Dosen von 100 mg eine tiefgreifende Umorientierung der LP im Sinne einer Verlagerung der LP mit hohen s_f -Konstanten gegen solche niederer s_f -Konstanten, wobei die Konzentration der niedereren Klassen vorübergehend ansteigt (16, 28, 44). Dieser Heparineffekt kann nach *Lever et al.* durch Protaminzufuhr aufgehoben werden (45).

Frank und *Pierce* demonstrierten in Tierexperimenten, daß sich der Umbau der LP immer von höheren zu niedereren Dichteklassen und nie in umgekehrter Richtung vollzieht (61).

Durch Verabreichung von Schilddrüsenpräparaten läßt sich die Konzentration der s_f^0 0–400-LP sowie des Serumcholesterins herabsetzen. Das Körpergewicht soll bei geeigneter Dosierung nicht wesentlich abnehmen (69, 70, 71).

Cortison hat beim Kaninchen eine Erhöhung verschiedener LP-Klassen zur Folge (62). Ein Effekt auf die LP im menschlichen Serum konnte von Bloom und Pierce weder bei kurzfristiger noch langdauernder Cortison- oder ACTH-Therapie beobachtet werden (6).

Die LP werden auch durch Röntgenbestrahlung des Organismus beeinflußt. Hewitt und Hayes (34) beobachteten, daß bei Kaninchen, Ratte und Hund dem Strahlentod ein relativ starker Konzentrationsanstieg der LP niederer Dichte vorausgeht.

1956 wurde der Schlußbericht über eine seit 1950 im Gange befindliche, im Auftrag des *National Advisory Heart Council* durchgeführte, großangelegte Untersuchungsserie vorgelegt (78), deren Hauptziel darin bestand, an Hand eines genügend großen Zahlenmaterials abzuklären, ob die Konzentrationswerte einzelner nach der Gofmanschen Methode bestimmten LP-Klassen die Früherfassung der zu Coronarsklerose neigenden Fälle erlauben, und ferner, ob in diesem Zusammenhang LP-Bestimmungen von größerem klinischen Wert als Gesamtcholesterinbestimmungen seien. Die Untersuchungen wurden als Gemeinschaftswerk von 4 Laboratorien in Californien (Donnerlaboratorium), Cleveland, Pittsburgh und Harvard unter der jeweiligen Leitung von J. W. Gofman, J. H. Page, M. A. Lauffer und F. J. Stare mit G. V. Mann vorgenommen. Die Planung und Organisation lag bei dem *Committee on Lipoproteins and Atherosclerosis*.

Es wurden die LP-Klassen s_f 12–20 und s_f 20–100 sowie das Gesamtcholesterin der Seren von 4914, im Zeitpunkt der Untersuchung keine Zeichen von Atherosklerose aufweisenden Männern im Alter von 40 bis 59 Jahren bestimmt. Innerhalb dieser Gruppe traten im Verlauf von ca. 2 Jahren, bezogen auf das Untersuchungsdatum, 82 Fälle mit manifester Herzkranzgefäßerkrankung auf. In 65 Fällen wurde die Diagnose Herzinfarkt als gesichert angesehen. Die auf diese Art vorgängig des Infarkt ereignisses erhaltenen LP- und Cholesterinwerte der Infarktpatienten wurden mit den entsprechenden Werten der Restgruppe verglichen.

Über die Interpretation der statistisch ausgewerteten Ergebnisse konnten sich die Forscher der vier Laboratorien nicht einigen. Übereinstimmend anerkannt wurde lediglich, daß die Atherosklerose, wie sie sich in klinischen Zeichen von Coronargefäßerkrankungen manifestiert, mit einer Störung des Lipidmetabolismus assoziiert ist, und daß den ver-

schiedenen in diesem Zusammenhang durchgeführten Lipidbestimmungen ein gewisser vorhersagender Wert zukommt.

Die Ansicht von *Gofman* et al., daß dem Atherogenic Index eine hohe Selektivität zur Erkennung Infarktgefährdeter zukommt und in dieser Hinsicht den Cholesterinkonzentrationswerten überlegen sei, wurde von den Forschern der drei anderen Laboratorien abgelehnt.

Dazu ist zu bemerken, daß die Berechnung des AI und die dazu erforderlichen Bestimmungen der Flotationsbereiche in Standardwerten: s_f^0 0–12 und s_f^0 12–400 nur vom Donner-Laboratorium für die eigenen Untersuchungen vorgenommen und für die Werte s_f 12–20 und s_f 20–100 der anderen Laboratorien geschätzt worden sind.

Dieser Bericht sowie das Symposium des *Technical Group Committee on Lipoproteins and Atherosclerosis* 1952 (77) geben jedenfalls wertvolle Aufschlüsse über die Schwierigkeiten, die mit quantitativen LP-Analysen verbunden sind. So ergaben unter anderem die von den verschiedenen Laboratorien an gleichen Seren durchgeführten Kontrollbestimmungen mangelhafte Übereinstimmungen der LP-Konzentrationswerte infolge fehlerhafter Zellenkonstruktion.

Daß diese Gemeinschaftsarbeit keine eindeutigeren Resultate lieferte, liegt nach *Eder* (14) hauptsächlich an der Tatsache, daß bei der endemischen Verbreitung der Atherosklerose in den Vereinigten Staaten die der Infarktgruppe gegenübergestellte Normalgruppe ungeeignet war. Dieser Autor sowie *Lawry* et al. (42) sind der Auffassung, daß für die Atheroskleroseforschung Normalgruppen, welche sich aus Kindern, jungen Frauen oder anderen Populationen rekrutieren, wo Herzkranzgefäß-erkrankungen selten sind, vorzuziehen wären.

Interessant sind auch folgende beiden Publikationen im Zusammenhang LP-Atherosklerose.

Paterson et al. (58) bestimmen in periodischen Zeitabständen die LP in der UZ und das Cholesterin an Patienten, die sich in dauerndem Spitalaufenthalt befinden. Diese Werte vergleichen sie mit dem post mortem bei der Autopsie festgestellten Grad der Atherosklerose. Auf Grund der Befunde an bisher 50 ad exitum gekommenen Fällen konnten diese Autoren keine konstante Relation der Konzentration der LP-Klassen s_f 0–12, s_f 12–20 und s_f 20–100 und des Cholesterins zum Ausmaß der Atherosklerose feststellen.

Hanig und *Shainoff* (31) analysierten dagegen in der UZ Extrakte von Atheromen aus unmittelbar nach dem Tode entnommenen Aorten in Flotationsversuchen. Die Flotationskonstanten des extrahierten Materials lagen bei der verwendeten Milieudichte von 1,065 im Bereiche s_f 12–100.

Eine wesentliche Voraussetzung für zuverlässige UZ-Analysen ist die

ausreichende Stabilität des zu untersuchenden Materials. Ray et al. (64) haben die auch von anderen Autoren (30, 61) beobachtete Instabilität der LP in ihrer Auswirkung auf das UZ-Diagramm untersucht. Diese Autoren fanden, daß die LP im Serum bei kühler Lagerung über Wochen hinaus stabil sind, daß die LP in isoliertem Zustand sich aber allmählich verändern, besonders schnell und ausgeprägt vor allem dann, wenn sie gegen Pufferlösungen oder reines Wasser dialysiert werden. Diese Degradation der LP wirkt sich im UZ-Diagramm durch eine Zunahme der Heterogenität des Materials, Ausbildung kompakter Schichten am Meniskus, Verkleinerung der Gradientenflächen, Auftreten von sedimentierenden Komponenten und Abnahme der Flotationskonstantengrößen aus. Für diese LP-Veränderungen wird ein durch Kupferionen katalysierter Oxydationsprozeß verantwortlich gemacht. LP-Konzentrate sollen demnach so rasch als möglich, längstens innert 3–4 Tagen, nach ihrer präparativen Auftrennung analysiert werden.

Eigene Untersuchungen

Eines der Ziele dieser Arbeit bestand darin, zu untersuchen, ob die Ultrazentrifugalanalyse der Lipoproteide niederer Dichte auch in einem salzärmeren als dem von Gofman und anderen in der Regel verwendeten Milieu unter Beibehaltung der Dichte von 1,063 durchführbar ist. Flotationsversuche in salzärmeren Lösungen hätten den großen Vorteil, im UZ-Diagramm eine gerade Basis aufzuweisen, womit die zur Lagebestimmung des sich allmählich einstellenden Salzgleichgewichtsgradienten erforderlichen Referenzversuche in Wegfall kämen. Die Eignung eines derartigen Milieus hängt davon ab, ob die in ihm gelösten LP im starken Zentrifugalfeld dann genügend stabil sind und sich entsprechend ihren Teilchengewichten und partiellen Volumina auftrennen, oder ob die von anderen Autoren (61, 30, 56, 64) in anderen Experimenten beobachtete Instabilität der LP auch hier auftritt.

Die Beurteilung der Stabilität der LP geschieht am besten durch Beobachtung des Verhaltens ihrer Gradienten oder Gradientengruppen über eine gewisse Zeitspanne im konstanten Schwerfeld. Es hat sich nun gezeigt, daß sich in ihm die Auftrennung der LP nicht immer in der Ausbildung von Gradienten manifestiert, sondern häufig nur an einer mehr oder weniger konstanten Ablenkung des Lichtstrahls über die Zelle hinweg erkenntlich ist. Die Ausbildung von Gradienten ist aber auch von experimentellen Faktoren abhängig, auf die im folgenden eingegangen wird.

Unsere Untersuchungen beziehen sich:

1. auf die Reproduktion der Gofmanschen Methode durch Bestim-

mung der Konzentration der s_f 0–10, s_f 10–20 und s_f 12–20-Klassen der Serum-LP niederer Dichte an einer Gruppe von Personen mit erwartungsgemäß niederen und einer solchen mit erwartungsgemäß höheren Konzentrationswerten hauptsächlich der s_f 10–20- und s_f 12–20-LP-Klassen,

2. auf die Untersuchung des Einflusses einiger experimenteller Faktoren auf die Diagramm-Struktur,

3. auf die während der Flotationsversuche auftretenden Veränderungen der LP-Diagramme, und

4. auf die Gegenüberstellung des nach *Gofman* errechneten Flotationsbereiches zum beobachteten Flotationsbereich der LP am Beispiel eines geeigneten, gut aufgelösten Normalserums.

Material und Methode

Die Untersuchungen wurden an 14 menschlichen Seren¹ durchgeführt.

Mit einer Ausnahme (Serum Si) waren es Seren weiblicher Personen. 7 Seren stammten von klinisch gesunden Personen oder von Patienten, deren Krankengeschichten keinen Hinweis auf Atherosklerose enthielten. Das Alter innerhalb dieser als «normal» aufgefaßten Gruppe lag zwischen 18 und 43 Jahren und betrug im Mittel 29 Jahre.

Die anderen 7 Seren wurden an Patientinnen, deren klinische Diagnose das Bestehen einer Atherosklerose und auf Grund Gofmanscher Untersuchungen (23, 25) eine Vermehrung der s_f 10–20- oder s_f 12–20-LP-Klassen erwarten ließ, entnommen. 6 Patientinnen litten an Diabetes mellitus verschiedenen Schweregrades, 1 Patientin (Her) hatte einen Ekg.-Befund, der auf eine mangelhafte Coronardurchblutung schließen ließ. Das Alter dieser Gruppe lag zwischen 54 und 82 Jahren und betrug im Mittel 65,7 Jahre.

Vorbereitende Maßnahmen zur Untersuchung des Materials

Die zur Herstellung der Serumproben erforderlichen Blutmengen wurden durch Venenpunktion am nüchternen Individuum entnommen und zur Gerinnung nicht länger als 8 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die Blutflüssigkeit wurde nach Abschöpfen durch Zentrifugierung von festen Bestandteilen befreit und im Kühlschrank bei -2°C bis zur Verarbeitung aufbewahrt. Diese erfolgte in der Regel nach wenigen Tagen, spätestens aber innerhalb von 14 Tagen und somit im Bereich der von *Gofman* tolerierten Frist von 28 Tagen (77).

¹ Die Seren wurden mir in entgegenkommender Weise von Herrn Dr. med. A. Thurnherr, Claraspital, Basel, zur Verfügung gestellt; ihm verdanke ich auch wertvolle Anregungen.

Zur Untersuchung der LP nach *Gofman* wurden in 2 Spinco-Röhrchen von je 13 cm³ Inhalt, passend zum Spinco-Rotortyp 40, je 5,5 cm³ Serum und 4,4 cm³ einer wässrigen NaCl-Lösung der Dichte 1,1315 ($\pm$ 0,005 Westphalsche Waage) bei 20° C mittels Präzisionspipetten eingefüllt. Nach gutem Durchmischen ihres Inhaltes wurden die Röhrchen in den auf 2° C vorgekühlten Rotor gesteckt, dessen Bohrungen mit Paraffinöl leicht eingefettet waren, um ihre Entnahme nach der Zentrifugierung zu erleichtern. Die präparative Zentrifugierung erfolgte bei 40 000 U/Min. = 105 500 g während 14–17 Stunden. Die Temperatur wurde am Regulierventil auf –5° C eingestellt. Die Temperatur des Rotors am Ende eines Laufes betrug dann annähernd 21–23° C, gemessen an in freigebiebenen Rotorbohrungen mitzentrifugiertem Wasser. Der Rotor wurde nach Ablauf der Zentrifugierungsdauer frei auslaufen gelassen.

Durch diese Arbeitsweise wurden die LP im Bereich des Meniskus stets gut angereichert und durch eine klare Lösungszone vom Sediment getrennt. Die nicht vollständig gefüllten Röhrchen zeigten im allgemeinen im oberen Drittel an der nach dem Rotorzentrum zugekehrten Seite Einbuchtungen.

Die Entnahme der LP-Konzentrate erfolgte mit einer 2 cm³-Spritze und 12er-Hohlnadel mit abgeschliffener Spitze. Die erwähnte Einbuchtung des Plastikröhrchens erleichtert nach unseren Erfahrungen die Entnahme, da sich während des Absaugens die LP an ihren vertikalen Kanten immerfort ansammeln.

Sofern im folgenden nichts anderes vermerkt ist, wurden die LP in 3facher Konzentration, bezogen auf ihre ursprüngliche Konzentration im Serum, entnommen, d. h. es wurden 1,8 cm³ mit dem darin enthaltenen Material abpipettiert. Diese Emulsion wurde im Kühlschrank bis zur analytischen Ultrazentrifugierung aufbewahrt, welche in der Regel noch am selben Tag, in einigen Fällen am darauffolgenden Tag erfolgte.

Parallel zu dieser nach *Gofman* durchgeführten Fraktionierung wurden die LP auch in einem salzärmeren Milieu angereichert. Zu diesem Zwecke wurde die Milieudichte des Serums durch Zusatz einer 1,27 %igen NaCl-Lösung in D₂O auf 1,063 bei 26° C eingestellt. Diese niedrige NaCl-Konzentration wurde deshalb gewählt, weil die Dichte einer wässrigen NaCl-Lösung gleicher Konzentration mit dem Wert von 1,007 bei 20° C laut Literaturangaben (11) der Dichte der eiweißfreien Serumlösung weitgehend entspricht, vor allem aber, weil bei dieser Salzkonzentration sich im LP-Diagramm im Verlauf der analytischen Ultrazentrifugierung kein störender Salzgleichgewichtsgradient ausbildet. Die Dichte dieser NaCl/D₂O-Lösung war nicht in allen Versuchen genau dieselbe, da der Reinheitsgrad des D₂O etwas schwankte. Die Dichte wurde aber jeweils

mittels der Westphalschen Waage bei 26° C bestimmt und der erforderliche Zusatz von NaCl/D₂O-Lösung für die Erhöhung der Dichte von 4,5 cm³ Serum auf 1,063 bei 26° C berechnet.

Die präparative Zentrifugierung erfolgte stets unter genau denselben Bedingungen, wie sie für die Reproduktion der Gofmanschen Methode angegeben worden sind.

Dieses LP-Konzentrat wurde ebenfalls in 3facher Konzentration, bezogen auf die ursprüngliche Konzentration der LP im Serum, entnommen; hierzu wurden je 1,5 cm³ Lösung abpipettiert.

Die analytische Ultrazentrifugierung

Die analytische Ultrazentrifugierung (79) der LP-Konzentrate erfolgte in sektorförmigen Zellen von 20 mm Schichtdicke und 16 mm Höhe. Der Blendenausschnitt begrenzt diese Höhe auf 14 mm. Der mittlere Radius des UZ-Rotors betrug stets 6,5 cm, auf welchen Wert sich die Angaben des Schwerfeldes beziehen.

Die Analysen wurden zunächst bei 48 000 U/Min. = 164 230 g durchgeführt. In späteren Versuchen wurde die Tourenzahl auf 42 000 U/Min. = 125 739 g reduziert, um auch von den rasch flotierenden Komponenten, deren Flotationskonstanten größenordnungsmäßig um s_f 100 liegen, ein scharfes Diagramm zu erhalten.

Die Temperatur der Wasserstoffatmosphäre um den Rotor blieb während der Versuche auf $\pm 0,1^\circ$ C konstant; sie lag im allgemeinen um 26° C.

In unserer optischen Einrichtung (80) zur diagrammatischen Aufzeichnung der Brechungsindex-Gradientenkurven ($\frac{dn}{dx}/x$ -Diagramm) wurde die schräge Schneide zunächst durch den schrägen Spalt und später durch eine neuartige Phasenplatte (81) ersetzt.

Für die Konzentrationsbestimmungen innerhalb gewisser Flotationsbereiche und für die Bestimmung der Flotationskonstanten einzelner Gradienten wurden von den Filmnegativen vergrößerte Zeichnungen angefertigt, in welchen die Basis der Diagramme in 20facher Vergrößerung dargestellt ist.

Die Flotationsgrenzen wurden nach der von *Gofman* ursprünglich verwendeten Berechnungsart (77) ohne Berücksichtigung des Verlangsamungseffektes bei zunehmender Gesamtkonzentration (self-slowng phenomen) und der Johnston-Ogston-Korrektur bestimmt. Die Hochfahzeit betrug für 48 000 U/Min. 690 Sek. und für 42 000 U/Min. 600 Sek.

Die Flächen der vergrößerten $\frac{dn}{dx}/x$ -Diagramme innerhalb der uns interessierenden s_f 0-10-, s_f 10-20- und s_f 12-20-Bereiche wurden durch Planimetrierung bestimmt und die erhaltenen Werte mittels der von

Pickels (zit. nach *De Lalla* [11]) für diesen Spezialfall modifizierten *Svensson-Formel* (73, 74) zur Konzentrationsbestimmung der LP in mg %-Absolutwerten herangezogen, wobei der radiale Konzentrations-effekt berücksichtigt wurde.

Der Wert des speziellen Brechungsinkrementes $n = 0,00154$ wurde von *Gofman* übernommen. Er ist seither experimentell von *Hanig* und *Shainoff* (30) noch genauer bestimmt worden.

Soweit die Flotationskonstanten einzelner Komponenten bestimmt wurden, kam die allgemein übliche, von *Svedberg* angegebene Berechnungsart in Anwendung.

Resultate

I. Konzentrationsbestimmungen

Tabelle 1 enthält die Konzentrationswerte der s_f 0-10-, s_f 10-20- und s_f 12-20-LP-Klassen der von uns untersuchten Seren in mg %-Absolutwerten. Die Werte der Normalseren sind von den Seren, welche sowohl auf Grund der klinischen Diagnose als auch des höheren Alters der Patienten eine Vermehrung der LP, speziell im Bereich der s_f 10-20 bzw. s_f 12-20-Klassen, erwarten ließ, getrennt aufgeführt.

Die sich entsprechenden Durchschnittswerte beider Gruppen unterscheiden sich deutlich voneinander. Die stärkste Abweichung um den Faktor 3,7 besteht zwischen den Durchschnittswerten der s_f 12-20-LP-Klasse gegenüber Abweichungen um die Faktoren 1,8 und 1,3 für die s_f 10-20- bzw. 0-10-LP-Klassen.

Die einzelnen Konzentrationswerte der s_f 10-20-LP-Klassen beider Gruppen entsprechen in ihrer Größenordnung den von *Gofman* u. Mitarb. bestimmten Werten (23, 25). Jene der s_f 12-20-LP innerhalb der Normalgruppe stimmen größenordnungsmäßig mit den von *Lawry* et al. (42) publizierten Einzelwerten überein.

Eine tabellarische Übersicht der Konzentrationswerte der s_f 0-10-LP-Klasse fanden wir indessen nicht in der uns zugänglichen Literatur. Unsere Werte lassen sich, allerdings nur sehr approximativ, mit den von *Glazier* et al. (18) für Normalseren bestimmten s_f 0-12-LP-Konzentrationswerten vergleichen.

Ein genauerer Vergleich mit den Ergebnissen aus der Literatur ist aber nicht möglich und auch nicht angestrebt worden, da es sich hier nur um prinzipielle Kontrollversuche handelte und keine klinische Fragestellung bestand.

Auf die Bedingungen, denen die UZ-Analysen der LP zur Erreichung vergleichbarer Konzentrationswerte genügen müssen, wird noch eingegangen.

Tabelle 1
Konzentrationswerte dreier LP-Klassen im Bereich s_f 0–20 in mg%

Serum	LP-Klassen		
	s_f 0–10	s_f 10–20	s_f 12–20
Normalgruppe			
Si	475	49	6
Ot	385	53	—
4. 6.	251	47	20
Li	281	38	10
Pe*	271	30	17
Me*	203	28	17
20. 3.*	351	51	26
Durchschnitt	317	42	14
Gruppe mit erwarteten höheren LP-Konzentrationen			
He	390	103	80
Chi	565	111	73
Fü	353	83	61
Bo*	500	65	40
Her*	478	76	45
St*	261	40	26
Hu*	355	61	39
Durchschnitt	415	77	52

* Diese Seren wurden bei 42 000 U/Min. = 125 739 g, die übrigen bei 48 000 U/Min. = 164 230 g untersucht.

II. Der Einfluß verschiedener experimenteller Bedingungen auf die Auftrennung der Lipoproteide in Einzelkomponenten während der analytischen Ultrazentrifugierung

A. Der Einfluß des NaCl-Gehaltes der Lösung

Von den Diagrammen Nr. 1–8 zeigen die linken Bilder den Auftrennungsvorgang in NaCl-reichem Milieu, während die rechten Bilder denselben Vorgang in der salzärmeren D₂O-haltigen NaCl-Lösung unter sonst genau gleichen experimentellen Bedingungen darstellen.

Die beiden oberen Diagrammpaare Nr. 1–4 stammen aus den Normalseren Pe und Me, die unteren Nr. 5–8 aus den Seren Chi und Her, welche eine Erhöhung der Serum-LP-Konzentration innerhalb der s_f 10–20- bzw. s_f 12–20-Klasse aufweisen (vgl. auch Tabelle 1).

Man erkennt zunächst, daß in allen Fällen die LP sich im salzärmeren Milieu in eine größere Anzahl von Komponenten auftrennen.

Die in allen Diagrammen hervortretende Hauptkomponente wird von langsam flotierenden LP gebildet, während die schneller flotierenden LP deutliche Unterschiede zeigen.

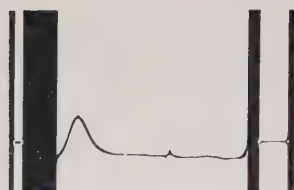


Diagramm Nr. 1 (Pe)

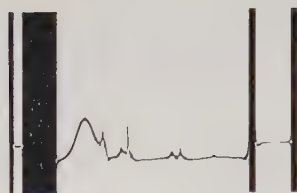


Diagramm Nr. 2 (Pe)

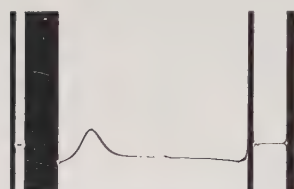


Diagramm Nr. 3 (Me)



Diagramm Nr. 4 (Me)

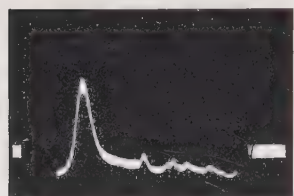


Diagramm Nr. 5 (Chi)

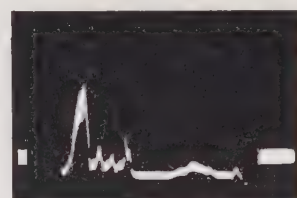


Diagramm Nr. 6 (Chi)

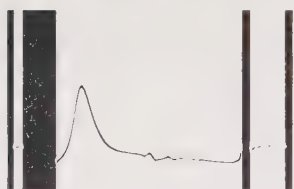


Diagramm Nr. 7 (Her)

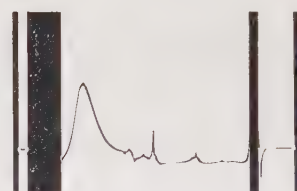


Diagramm Nr. 8 (Her)

Die einzelnen Gradienten dieser LP sind aber nicht alle über eine längere Laufzeit hinweg stabil, so daß ihre Beobachtung beschränkt und die Bestimmung ihrer Flotationskonstante nicht immer möglich ist.

In Tabelle 2 sind die Flotationskonstanten der stabilen Gradienten aus den Diagrammen 1–8 zusammengestellt. Die Werte sind in der Reihenfolge von links nach rechts entsprechend der Wanderungsrichtung des Materials in den Diagrammen zu lesen. Wenn auch die einzelnen Werte an sich nicht viel aussagen, so sieht man andererseits, daß im salzärmeren Milieu eine größere Anzahl von Flotationskonstanten bestimmt werden kann. Auffallend ist, daß die mit * bezeichnete Komponente des

Tabelle 2
Flotationskonstanten stabiler Gradienten

Serum	Milieu						
	salzreich		salzarm				
Pe	5,5		6,9	7,3	9,0	11,6	17,8
Me	7,4	18,0	7,0	11,3			
Chi	7,0	11,2	5,9	9,7	10,3	10,5	9,8*
Her	6,4	23,2	6,3	11,0	13,1	14,7	22,0

LP-Konzentrates Chi eine Lage im Diagramm einnimmt, die ihr weder auf Grund ihres eigenen Flotationskonstantenwertes, noch auf Grund der Flotationswerte der ihr folgenden Komponenten zukommt. Dieser Befund, den wir mehrfach, teilweise auch an Gradienten in salzreichem Milieu, erheben konnten, läßt auf eine atypisch verlaufende Auftrennung schließen.

B. Der Einfluß der Tourenzahl

Die Diagramme Nr. 9 und 10 sind Flotationsdiagramme der in gleicher, 3facher Konzentration und im gleichen, salzarmen Milieu aufgelösten LP des Serums Si.

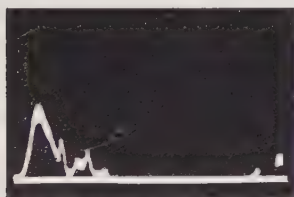


Diagramm Nr. 9

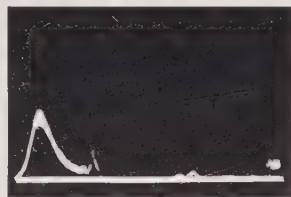


Diagramm Nr. 10

Diese Diagramme zeigen, bei $u = 48\,000$ und $u = 42\,000$ und ungleichen Zeiten aufgenommen, etwa die gleiche Lage der Gradienten im Bild. Man erkennt, daß das Diagramm Nr. 9 ($u = 48\,000$) bei kürzerer Laufzeit eine bessere Auflösung als das Diagramm Nr. 10 bei längerer Laufzeit zeigt.

C. Der Einfluß der gesamten Lipoproteidkonzentration in salzarmem und in salzreichem Milieu

Die Diagramme Nr. 11–14 sind Flotationsdiagramme der LP des Serums Bo, zentrifugiert bei $42\,000\text{ U/Min.} = 125\,739\text{ g}$ und aufgenommen zur gleichen Zeit $t = 3000\text{ Sek.}$, in salzarmem Milieu (NaCl in D_2O -Zusatz).

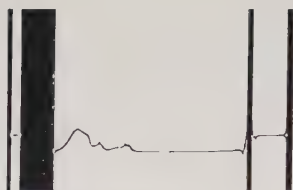


Diagramm Nr. 11

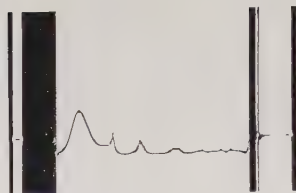


Diagramm Nr. 12

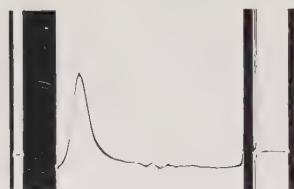


Diagramm Nr. 13

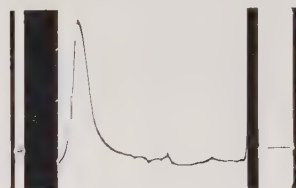


Diagramm Nr. 14

Die Konzentration der LP ist, bezogen auf ihre ursprüngliche Konzentration im Serum:

im Diagramm Nr. 11 0,75fach,

im Diagramm Nr. 12 1,5fach,

im Diagramm Nr. 13 3,0fach,

im Diagramm Nr. 14 5,0fach.

Die beste Auftrennung zeigt das Diagramm Nr. 12, aufgenommen bei 1,5facher Konzentration.

Die Diagramme Nr. 15–18 sind genau gleich Flotationsdiagramme der LP desselben Serums Bo in salzreichem Milieu (NaCl in H_2O -Zusatz mit entsprechend erhöhter NaCl-Konzentration).



Diagramm Nr. 15



Diagramm Nr. 16

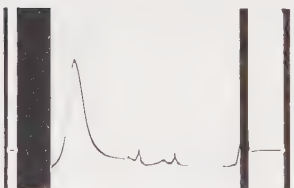


Diagramm Nr. 17

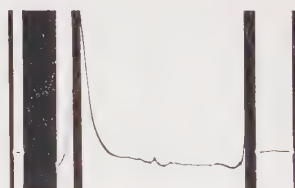


Diagramm Nr. 18

Die beste Auftrennung zeigt hier das Diagramm Nr. 17, aufgenommen bei 3facher Konzentration.

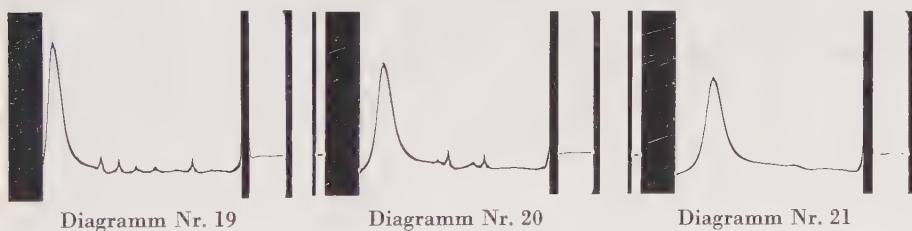
Die nachfolgende Tabelle Nr. 3 enthält die Flotationskonstanten der Hauptkomponenten dieser Versuchsserie. Sie demonstriert, daß mit zunehmender Gesamtkonzentration des flotierenden Materials die Flotationskonstanten in salzreichem Milieu kleiner werden (self-slowng effect). Im salzärmeren Milieu kann dieser Effekt nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 3
Flotationskonstanten der Hauptkomponenten des Serums Bo in
Abhängigkeit von der Lipoproteidkonzentration

Konzentration der Lipoproteide bezogen auf ihre ursprüngliche Konzentration im Serum	Milieu	
	salzreich	salzarm
5fach	s_f 5,5	s_f 6,1
3fach	s_f 6,4	s_f 6,1
1,5fach	s_f 6,8	s_f 5,8
0,75fach	s_f 6,9	s_f 6,2

III. Während der Versuchsdauer beobachtete Veränderungen in den Flotationsdiagrammen

Die LP-Diagramme Nr. 19–21 des Serums Bo mit erhöhten s_f 10–20-
Werten sind Aufnahmen desselben Versuches in salzreichem Milieu zu
den Zeiten $t = 2000$ Sek., $t = 3000$ Sek. und $t = 4000$ Sek. (nach Er-
reichung der vollen Drehzahl).



Die Höhe der Hauptkomponente nimmt mit der Zeit ab, während ihre
Breite gleichzeitig zunimmt. Auch die kleineren, rascher flotierenden
Vorgipfel flachen sich, wenn auch nicht so gleichmäßig, mit der Zeit ab,
bis sie, teilweise noch vor ihrem Verschwinden im Meniskus, nicht mehr
zu unterscheiden sind. Diese Veränderungen der Gradienten sind in der
Hauptsache eine Folge der Diffusion; sie werden bei sich in typischer
Weise auftrennenden Gemischen stets beobachtet.

Die LP-Diagramme Nr. 22 und 23 des Normalserums Li sind Aufnahmen desselben Versuches in salzarmem Milieu zu den Zeiten $t = 2000$ Sek. bzw. $t = 4000$ Sek.

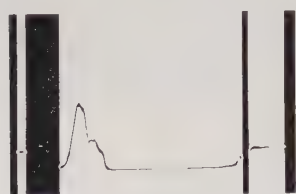


Diagramm Nr. 22

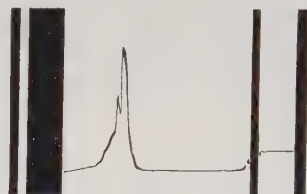


Diagramm Nr. 23

Hier trennt sich die zur Zeit $t = 2000$ Sek. sichtbare Gradientengruppe nicht weiter auf. Auch findet keine Abflachung der Gipfel durch Diffusion, sondern im Gegenteil eine Schärfung derselben statt.

Dieses Phänomen wird sehr häufig bei Untersuchungen in salzarmem Milieu beobachtet. Häufig betrifft es nur einzelne Vorgipfel, die sich dann unter Umständen, statt weiter aufzutrennen, in einen hohen und steilen Gradienten vereinigen.

In der salzreicheren Lösung haben wir diese Erscheinung viel seltener und wenn, dann in bedeutend weniger eindrucklichem Maße beobachtet.

IV. Gegenüberstellung eines nach De Lalla und Gofman errechneten Flotationsbereiches zum beobachteten Flotationsbereich der Lipoproteide

In den Abbildungen 1 und 2, die den bei $t = 2000$ Sek. und $t = 4000$ Sek. aufgenommenen Bildern eines UZ-Versuches (Serum Ot) in NaCl-reichem Milieu nach Gofman entsprechen, vergleichen wir zu den angegebenen Zeiten das experimentelle Ergebnis mit der graphischen Festlegung der Standardflotationslinien nach De Lalla und Gofman (77) im Flotationskonstantenbereich 10–12.

Die Zeichnungen geben zunächst über der gekrümmten Basis die $\frac{dc}{dx}/x$ -Diagramme und die zugehörigen c/x -Kurven wieder. Die auf der Basis eingetragenen s_f 10- und s_f 12-Punkte definieren die von De Lalla und Gofman berechneten Flotationskonstantenwerte für unendliche Verdünnung, während die ebenfalls auf der Basis eingetragenen s_f^0 10- und s_f^0 12-Punkte den berechneten Flotationskonstanten für die gegebenen Konzentrationen entsprechen, die sich nach De Lalla und Gofman von den Werten für unendliche Verdünnung aus einer linearen Beziehung (schräge Linien) und der Konzentration c (Schnittpunkt der schrägen Linien mit den Konzentrationskurven) durch Fällen des Lots ableiten.

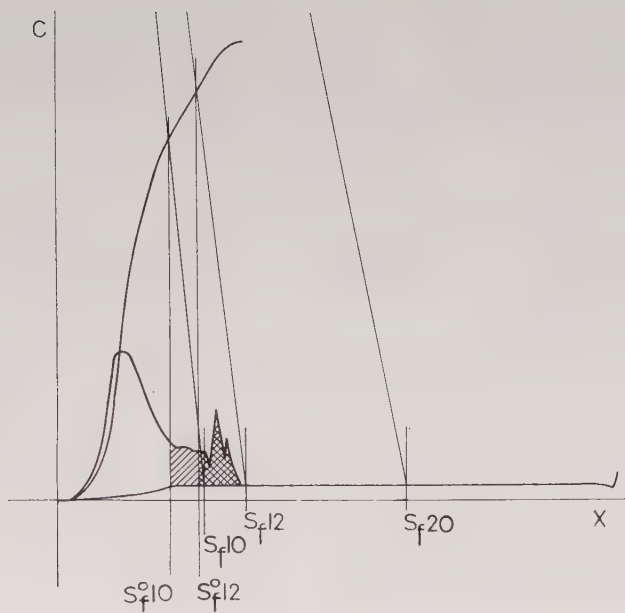


Abb. 1

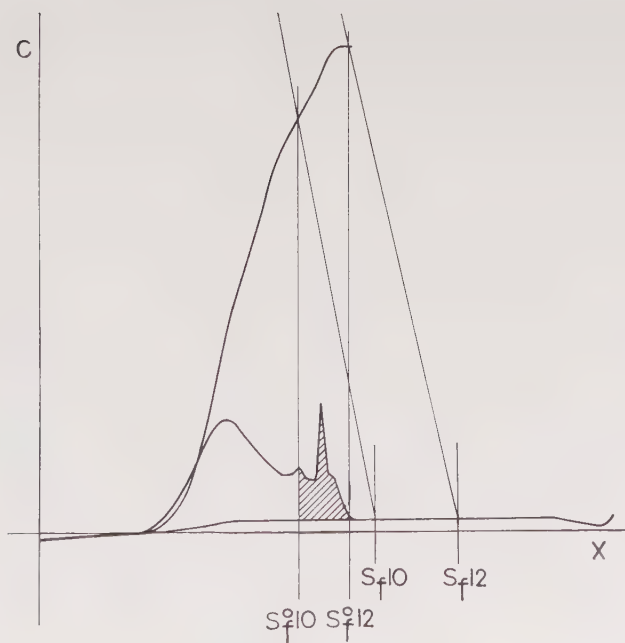


Abb. 2

Abb. 1 und 2. Vergleich der bei zwei verschiedenen Zeiten aufgenommenen Bilder eines UZ-Versuches mit den zugehörigen Standardflotationslinien nach *De Lalla* und *Gofman*.

Die Zeichnungen lassen erkennen, daß dem s_f^0 10–12-Bereich zu verschiedenen Zeiten (2000 bzw. 4000 Sek.) verschiedene Teile des Diagramms entsprechen, womit eine graphische Festlegung von Standardflotationsbereichen als problematisch erscheint.

Diskussion

Wird die UZ-Analyse der LP niederer Dichte unter Verwendung von D_2O in einem Medium durchgeführt, dessen Salzgehalt so niedrig gehalten ist, daß der Gleichgewichtsgradient der Salze vernachlässigt werden kann, so läßt das Diagramm in der Regel eine größere Zahl Gradienten erkennen als bei Untersuchungen in konzentrierteren Salzlösungen. Diese Gradienten lassen sich oft über einen genügend großen Zeitabschnitt verfolgen, so daß ihre Flotationskonstanten bestimmt werden können (Beispiel Tabelle 2). Andererseits scheint im salzarmen Milieu, häufiger als im salzreichen, der Auftrennungsvorgang in seinem Verlauf gestört zu sein. Statt sich allmählich voneinander zu entfernen, können sich die bereits getrennten Gradienten wieder vereinigen. Statt der diffusionsbedingten Verflachung kommt es öfters zur Schärfung der Gipfel. Das salzärmere Medium kann deshalb, trotz der besseren Auflösung der Diagramme und Wegfall der gekrümmten Basis, für Konzentrationsbestimmungen innerhalb von Flotationsbereichen, dem salzreicheren Milieu nicht generell als überlegen betrachtet werden.

Die Ausbildung von Komponenten ist zudem abhängig von der LP-Konzentration, wobei die für die Darstellung möglichst vieler Gradienten günstigste Konzentration, wie wir in mehreren Versuchen feststellen konnten, unterschiedlich ist. In einem hier angeführten Beispiel war sie in salzreichem Milieu 3fach und in salzärmerem Medium 1,5fach, bezogen auf die LP-Konzentration im nativen Serum.

Unter der Einwirkung stärkerer Zentrifugalfelder vollzieht sich die Auftrennung schneller, und es bilden sich erwartungsgemäß mehr Komponenten im Diagramm aus. Bei feingezeichneten Diagrammen, wie sie bei Verwendung der Phasenplatte erhalten werden, zeigen bei 48 000 U/Min. und einer photographischen Expositionszeit von 15 Sek. die in dieser Arbeit allerdings nicht ausgewerteten Komponenten im Bereich s_f 100 bereits Bewegungsunschärfen.

An geeigneten Diagrammen, deren Gradienten genügend stabil sind und sich über einen längeren Zeitabschnitt beobachten lassen, zeigt es sich, daß weder die durch s_f -Linien, noch die durch s_f^0 -Linien begrenzten Flotationsbereiche zu verschiedenen Zeiten den gleichen Abschnitt des Diagramms ausschneiden, wie aus den Abbildungen 1 und 2 hervorgeht. Diese Verschiebung der s_f -Linien gegenüber den Komponenten konnte

mehrfach beobachtet werden und wächst mit der Stärke des Gravitationsfeldes. Demzufolge sind vergleichbare Konzentrationsbestimmungen innerhalb eines beliebigen Flotationsbereiches an gleiche Gravitationsfeldstärken und gleiche Aufnahmezeiten (bei gleicher Hochfahrzeit) gebunden. Unsere Konzentrationsbestimmungen bei 2 verschiedenen Tourenzahlen können aus diesem Grunde nur größenordnungsmäßig unter sich und mit den Werten der Literatur verglichen werden.

Die Auftrennung der LP im starken Gravitationsfeld wird von vielen als die für diese Serumfraktion spezifische Methode angesehen. Die Messung der LP niederer Dichte in der analytischen UZ ist aber mit zahlreichen Schwierigkeiten verbunden. Diese beruhen vor allem auf der bekannten Heterogenität und Labilität der LP niederer Dichte. Vergleichbare Resultate sind nur im Falle genau gleicher Versuchsbedingungen zu erhalten.

Zusammenfassung

Es wurden einerseits an einer kleinen Gruppe klinisch gesunder Personen und andererseits an einer weiteren Gruppe, die vorwiegend Fälle von Atherosklerose mit Diabetes mellitus umfaßte, die Konzentrationen der s_f 0-10-, s_f 10-20- und s_f 12-20-Lipoproteidklassen nach *Gofman* bestimmt. Die größte Abweichung wurde zwischen den Durchschnittswerten der s_f 12-20-Lipoproteidklasse dieser Gruppen gefunden. Die Einzelwerte sind größenordnungsmäßig im Rahmen der in der Literatur angegebenen Werte.

Sodann wurden mit demselben Material Flotationsversuche der Lipoproteide niederer Dichte in salzärmerem D₂O-haltigem Milieu ausgeführt. Sie zeigten in der Regel mehr, aber unstabilere Gradienten als die Untersuchungen in konzentrierteren Salzlösungen.

Die Zahl der darstellbaren Komponenten der Lipoproteide wird durch die Stärke des Gravitationsfeldes und die Konzentration der Lipoproteide beeinflusst.

Die nach *Gofman* errechneten Flotationsbereiche schneiden zu verschiedenen Versuchszeiten nicht den gleichen Abschnitt des Lipoproteiddiagrammes aus. Vergleichbare Konzentrationsbestimmungen der Lipoproteide innerhalb eines beliebigen Flotationsbereiches erfordern deshalb gleiche Gravitationsfeldstärken und gleiche Aufnahmezeiten.

Résumé

La détermination de la concentration des lipoprotéines des classes s_f 0-10, s_f 10-20 et s_f 12-20, selon la méthode de *Gofman*, a été faite, d'une

part, dans un groupe de personnes cliniquement en bonne santé, d'autre part, dans un groupe de personnes atteintes de diabète sucré avec athérosclérose. Ce sont les valeurs moyennes des lipoprotéines de la classe s_f 12-20 qui ont montré les plus grandes différences dans ces deux groupes. Les valeurs individuelles sont de l'ordre de grandeur des chiffres publiés dans la littérature médicale. Puis, avec le même matériel, l'auteur fait des essais de flottation des lipoprotéines de faible densité dans des milieux plus pauvres en sels, mais contenant du D_2O . En règle générale, ils ont montré des gradients plus nombreux, mais à la fois plus variables que dans les essais avec des solutions plus concentrées en sels.

Le nombre des composants des lipoprotéines mis en évidence est en relation avec l'intensité du champ de gravitation et la concentration des lipoprotéines.

Les zones de flottation, selon *Gofman*, ne correspondent pas toujours au même segment des diagrammes des lipoprotéines, si l'on choisit dans les essais des temps différents de régistration. C'est pourquoi si l'on veut comparer des déterminations de concentration des lipoprotéines dans une zone de flottation quelconque, il faut réaliser les mêmes champs de gravitation et les mêmes temps de régistration.

Riassunto

L'autore ha determinato, secondo il metodo di *Gofman*, le concentrazioni delle classi di lipoproteina s_f 0-10, s_f 10-20 e s_f 12-20 dapprima in un piccolo gruppo di persone clinicamente sane e quindi in un gruppo comprendente in prevalenza casi di arteriosclerosi con diabete mellito. La differenza maggiore fu constatata per i valori medi della classe lipoproteica s_f 12-20. I valori singoli corrispondono in ordine di grandezza a quelli della letteratura.

Poi con lo stesso materiale vennero eseguite esperienze di flottazione delle lipoproteine di bassa densità in un mezzo contenente D_2O a concentrazione salina minore. Tali esperienze rivelarono di regola gradienti maggiori ma più instabili di quelle in soluzioni saline più concentrate.

Il numero dei componenti lipoproteici separabili è influenzato dall'intensità del campo gravitazionale e dalla concentrazione delle lipoproteine.

I campi di flottazione calcolati secondo *Gofman* non coprono lo stesso segmento del diagramma lipoproteico se eseguiti in tempi diversi. Perciò è necessario, onde ottenere concentrazioni comparabili, per un determinato campo di flottazione, eseguire le determinazioni con la stessa intensità del campo gravitazionale e registrare nello stesso tempo.

Summary

In two groups of persons, one a small group of clinically healthy persons and the other group comprising mostly cases of atherosclerosis with diabetes mellitus, the concentrations of s_f 0–10, s_f 10–20 and s_f 12–20 lipoprotein classes were determined according to *Gofman*. The greatest variations were found between the averages of the s_f 12–20 lipoprotein class of these groups. The individual values were within the limits of the values given in the literature.

With the same material, flotation tests of low-density lipoproteins were next made in a milieu poor in salt and containing D_2O . These tests showed as a rule more, but less stable, gradients than the tests in more concentrated salt solutions.

The number of demonstrable components of the lipoproteins is influenced by the strength of the gravitation field and the concentration of the lipoproteins.

The flotation zones reckoned according to *Gofman* do not come into the same sections of the lipoprotein diagram if taken at different times during the test. Comparable determinations of concentration of the lipoproteins within an arbitrary flotation zone therefore require, besides the same gravitation-field, the same time of registration.

Diese Arbeit wurde von der Schweizerischen Akademie der medizinischen Wissenschaften angeregt und gefördert und ihre Ausführung durch die großzügige Unterstützung der Firma Sandoz AG ermöglicht. Für Anleitung und kritische Beratung bin ich Herrn Dr. E. Wiedemann, physikalisch-chemisches Laboratorium der Sandoz AG zu ganz besonderem Dank verpflichtet.

1. *Adair, G. S., and Adair, M. E.*: A protein of low-density prepared from human serum. *J. Physiol.* **102**, 17 P (1943).
2. *Aladjem, F., Liebermann, M., and Gofman, J. W.*: Immunochemical studies on human plasma-lipoproteins. *J. exp. Med.* **105**, 49 (1957).
3. *Aladjem, F., and Rubin, L.*: Serum lipoprotein changes during fasting in rabbits. *Amer. J. Physiol.* **178**, 267 (1954).
4. *Barr, D. P., Russ, E. M., and Eder, H. A.*: Protein-lipid relationships in human plasma: II. In atherosclerosis and related conditions. *Amer. J. Med.* **11**, 480 (1951).
5. *Blix, G., Tiselius, A., and Svensson, H.*: Lipid and polysaccharides in electrophoretically separated blood serum proteins. *J. biol. Chem.* **137**, 485 (1941).
6. *Bloom, B., and Pierce, F. T. jr.*: Relationship of ACTH and cortisone to serum lipoproteins and atherosclerosis in humans. *Metabolism* **1**, 155 (1952).
7. *Boyd, G. S.*: The estimation of serum lipoproteins. A micromethod based on zone electrophoresis and cholesterol estimation. *Biochem. J.* **58**, 680 (1954).
8. *Cohn, E. J., Gurd, F. R. N., Surgenor, D. M., Barnes, B. A., Brown, R. K., Derouaux, G., Gillespie, J. M., Kahnt, F. W., Lever, W. F., Liu, C. H., Mittelman, D., Mouton, R. F., Schmid, K., and Uroma, E.*: A system for separation of the components of human blood: Quantitative procedures for separation of the protein components of human plasma. *J. Amer. chem. Soc.* **72**, 465 (1950).

9. Cohn, E. J., Strong, L. E., Hughes, W. L., Mulford, D. J., Ashworth, J. N., Melin, M., and Taylor, H. L.: Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J. Amer. chem. Soc.* **68**, 459 (1946).
10. De Lalla, O. F., Elliott, H. A., and Gofman, J. W.: Ultracentrifugal studies on high-density serum lipoproteins in clinically healthy adults. *Amer. J. Physiol.* **179**, 333 (1954).
11. De Lalla, O. F., and Gofman, J. W.: Ultracentrifugal analysis of serum lipoproteins. *Methods of Biochemical Analysis*, vol. 1. Ed. by D. Glick, New York 1954. Interscience Publishers.
12. Durrum, E. L., Paul, M. H., and Smith, E. R. B.: Lipid detection in paper electrophoresis. *Science* **116**, 428 (1952).
13. Eder, H. A., Russ, E. M., Pritchett, R. A. R., Wilber, M. M., and Barr, D. P.: Protein-lipid relationships in human plasma: in biliary cirrhosis, obstructive jaundice, and acute hepatitis. *J. clin. Invest.* **34**, 1147 (1955).
14. Eder, H. A.: The lipoproteins of serum. *Amer. J. Med.* **23**, 269 (1957).
15. Eiber, H. B., Sang, J. B., and Danishefsky, J.: Free electrophoresis of lipoproteins. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **92**, 700 (1956).
16. Engelberg, H., Gofman, J. W., and Jones, H. B.: Serum lipids and lipoproteins in diabetic glomerulosclerosis: Preliminary observations of the effect of heparin upon the disease. *Diabetes* **1**, 425 (1952).
17. Freeman, N. K., Lindgren, F. T., Ng, Y. C., and Nichols, A. V.: Infra-red spectra of some lipoproteins and related lipids. *J. biol. Chem.* **203**, 293 (1953).
18. Glazier, F. W., Tamplin, A. R., Strisower, B., De Lalla, O. F., Gofman, J. W., Dawber, T. R., and Philips, E.: Human serum lipoprotein concentrations. *J. Geront.* **9**, 395 (1954).
19. Gofman, J. W.: Biophysical approaches to atherosclerosis. *Advances in biological and medical physics*. Edited by J. H. Lawrence and J. G. Hamilton, New York 1951. Academic Press.
20. Gofman, J. W., Glazier, F. W., Tamplin, A. R., Strisower, B., and De Lalla, O. F.: Lipoproteins, coronary heart disease, and atherosclerosis. *Physiol. Rev.* **34**, 589 (1954).
21. Gofman, J. W., and Jones, H. B.: Obesity, fat metabolism and cardiovascular disease. *Circulation* **5**, 514 (1952).
22. Gofman, J. W., Jones, H. B., Lindgren, F. T., Lyon, T. P., Elliott, H. A., and Strisower, B.: Blood lipids and human atherosclerosis. *Circulation* **2**, 161 (1950).
23. Gofman, J. W., Jones, H. B., Lyon, T. P., Lindgren, F. T., Strisower, B., Colman, D., and Herring, V.: Blood lipids and human atherosclerosis. A symposium. *Circulation* **5**, 119 (1952).
24. Gofman, J. W., Lindgren, F. T., and Elliott, H. A.: Ultracentrifugal studies of lipoproteins of human serum. *J. biol. Chem.* **179**, 973 (1949).
25. Gofman, J. W., Lindgren, F. T., Elliott, H. A., Mantz, W., Hewitt, J., Strisower, B., Herring, V., and Lyon, T. P.: The role of lipids and lipoproteins in atherosclerosis. *Science* **111**, 166 (1950).
26. Gofman, J. W., Rubin, L., McGinley, J. P., and Jones, H. B.: Hyperlipoproteinemia. *Amer. J. Med.* **17**, 514 (1954).
27. Gofman, J. W., Strisower, B., De Lalla, O. F., Tamplin, A. R., Jones, H. B., and Lindgren, F. T.: Index of coronary artery atherogenesis. *Mod. Med.* **21**, 119 (1953).
28. Graham, D. M., Lyon, T. P., Gofman, J. W., Jones, H. B., Yankley, A., Simonton, J., and White, S.: Blood lipids and atherosclerosis. II. The influence of heparin upon lipoprotein metabolism. *Circulation* **4**, 666 (1951).
29. Green, A. A., Lewis, L. A., and Page, J. H.: A method for ultracentrifugal analysis of alpha- and beta-serum lipoproteins. *Fed. Proc.* **10**, 191 (1951).

30. Hanig, M., and Shainoff, J. R.: Specific refractive increment of serum lipoproteins obtained by flotation. *J. biol. Chem.* **219**, 479 (1956).
31. Hanig, M., Shainoff, J. R., and Lowy, A. D. jr.: Flotational lipoproteins extracted from human atherosclerotic aortas. *Science* **124**, 176 (1956).
32. Havel, R. J., Eder, H. A., and Bragdon, J. H.: The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. clin. Invest.* **34**, 1345 (1955).
33. Herbst, F. S. M., Lever, W. F., and Hurley, N. A.: Idiopathic hyperlipemia and primary hypercholesteremic xanthomatosis. VI. Studies on the serum proteins and lipoproteins by moving boundary electrophoresis and paper electrophoresis before and after administration of heparin. *J. invest. Derm.* **24**, 507 (1955).
34. Hewitt, J. E., and Hayes, Th. L.: X-Irradiation and lipoprotein metabolism in various species. *Amer. J. Physiol.* **185**, 257 (1956).
35. Jahnke, K.: Klinische Ultrazentrifugen-Untersuchungen. III. Mitteilung: Die Lipoproteide im Serum, ihre Differenzierung und klinische Bedeutung. *Z. ges. exp. Med.* **125**, 59 (1955).
36. Jencks, W. P., and Durrum, E. L.: Paper electrophoresis as a quantitative method: The staining of serum lipoproteins. *J. clin. Invest.* **34**, 1437 (1955).
37. Johnston, J. P., and Ogston, A. G.: A boundary anomaly found in the ultracentrifugal sedimentation of mixtures. *Trans. Faraday Soc.* **42**, 789 (1946).
38. Jones, H. B., Biggs, M., Graham, D. M., Rosenthal, D., Gofman, J. W., and Kritchevsky, D.: Studies of the dynamic transfer of isotopically labeled constituents of serum lipoproteins. *Circulation* **4**, 475 (1951).
39. Jones, H. B., Gofman, J. W., Lindgren, F. T., Lyon, T. P., Graham, D. M., Strisower, B., and Nichols, A. V.: Lipoproteins in atherosclerosis. *Amer. J. Med.* **11**, 358 (1951).
40. Kunkel, H. G., and Slater, R. J.: Lipoprotein patterns of serum obtained by zone electrophoresis. *J. clin. Invest.* **31**, 677 (1952).
41. Langan, T. A., Durrum, E. L., and Jenks, W. P.: Paper electrophoresis as a quantitative method: measurement of alpha- and beta-lipoprotein cholesterol. *J. clin. Invest.* **34**, 1427 (1955).
42. Lawry, E. Y., Mann, G. V., Peterson, A., Wysocki, A. P., O'Connell, R., and Stare, F. J.: Cholesterol and beta-lipoproteins in the serums of Americans: well persons and those with coronary heart disease. *Amer. J. Med.* **22**, 605 (1957).
43. Lever, W. F., Gurd, F. R. N., Uroma, E., Brown, R. K., Barnes, B. A., Schmid, K., and Schultz, E. L.: Chemical, clinical and immunological studies on the products of the human plasma fractionation. XL. Quantitative separation and determination of the protein components in small amounts of normal human plasma. *J. clin. Invest.* **30**, 99 (1951).
44. Lever, W. F., Herbst, F. S. M., and Lyons, M. E.: Idiopathic hyperlipemia and primary hypercholesteremic xanthomatosis. V. Analysis of serum lipoproteins by means of ultracentrifuge before and after administration of heparin. *Arch. Derm. Syph. (Chicago)* **71**, 158 (1955).
45. Lever, W. F., and Lyons, M. E.: Idiopathic hyperlipemia and primary hypercholesteremic xanthomatosis. VIII. Effects of protamine on the electrophoretic and ultracentrifugal changes produced in the serum by heparin. *J. invest. Derm.* **27**, 325 (1956).
46. Levine, L., Kaufmann, D. L., and Brown, R. K.: The antigenic similarity of human low-density lipoproteins. *J. exp. Med.* **102**, 105 (1955).
47. Lewis, L. A., Green, A. A., and Page, I. H.: Ultracentrifuge lipoprotein pattern of serum of normal, hypertensive and hypothyroid animals. *Amer. J. Physiol.* **171**, 391 (1952).
48. Lewis, L. A., and Page, I. H.: Electrophoretic and ultracentrifugal analysis of serum lipoproteins of normal, nephrotic and hypertensive persons. *Circulation* **7**, 707 (1953).

49. Lindgren, F. T., Elliott, H. A., Gofman, J. W., and Strisower, B.: The ultracentrifugal composition of normal rabbit serum. *J. biol. Chem.* **182**, 1 (1949).
50. Lindgren, F. T., Elliott, H. A., and Gofman, J. W.: The ultracentrifugal characterization and isolation of human blood lipids and lipoproteins, with applications to the study of atherosclerosis. *J. Phys. and Colloid Chem.* **55**, 80 (1951).
51. Machebœuf, M. A.: Recherches sur les phosphoaminolipides et les stérides du sérum et du plasma sanguins. 1. Entrainement des phospholipides, des stérols et des stérides par les diverses fractions au cours du fractionnement des protéides du sérum. *Bull. Soc. Chim. biol. (Paris)* **11**, 268 (1929).
52. McFarlane, A. S.: The ultracentrifugal protein sedimentation diagramm of normal human, cow and horse serum. *Biochem. J.* **29**, 660 (1935).
53. Middleton, E. jr.: Immunochemical relationship of human plasma beta-lipoprotein and chylomicrons. *Amer. J. Physiol.* **185**, 309 (1955).
54. Nichols, A. V., Dobbin, V., and Gofman, J. W.: Influence of dietary factors upon human serum lipoprotein concentrations. *Geriatrics* **12**, 7 (1957).
55. Oncley, J. L., and Gurd, F. R. N.: The lipoproteins of human plasma. In: *Blood Cells and Plasma Proteins, Their State in Nature*. Edited by Tullis J. L., New York 1953, Academic Press Inc.
56. Oncley, J. L., Gurd, F. R. N., and Melin, M.: Preparation and properties of serum and plasma proteins. XXV. Composition and properties of human serum beta-lipoprotein. *J. Amer. chem. Soc.* **72**, 458 (1950).
57. Oncley, J. L., and Mannick, V. G.: Sedimentation analysis of plasma proteins, p. 1. *Amer. chem. Soc. 126th Meeting* New York 1954.
58. Paterson, J. C., Cornish, B. R., and Armstrong, E. C.: The serum lipids in human atherosclerosis. An interim report. *Circulation* **13**, 224 (1956).
59. Pedersen, K. O.: Ultracentrifugal studies on serum and serum fractions. Uppsala 1945.
60. Pedersen, K. O.: On a low-density lipoprotein appearing in normal human plasma. *J. Phys. and Colloid Chem.* **51**, 156 (1947).
61. Pierce, F. T. jr.: The interconversion of serum lipoproteins in vivo. *Metabolism* **3**, 142 (1954).
62. Pierce, F. T. jr., and Bloom, B.: Relationship of ACTH and cortisone to the serum lipoproteins of the rabbit. *Metabolism* **1**, 163 (1952).
63. Pierce, F. T. jr., and Gofman, J. W.: Lipoproteins, liver disease and atherosclerosis. *Circulation* **4**, 25 (1951).
64. Ray, R. B., Davidsson, E. O., and Crespi, H. L.: Experiments on the degradation of lipoproteins from serum. *J. Phys. Chem.* **58**, 841 (1954).
65. Rubin, L., and Aladjem, F.: Serum lipoprotein changes during fasting in man. *Amer. J. Physiol.* **178**, 263 (1954).
66. Russ, E. M., Eder, H. A., and Barr, D. P.: Protein-lipid relationships in human plasma: I. In normal individuals. *Amer. J. Med.* **11**, 468 (1951).
67. Russ, E. M., Raymont, J., and Barr, D. P.: Lipoproteins in primary biliary cirrhosis. *J. clin. Invest.* **35**, 133 (1956).
68. Smith, E. B.: Lipoprotein patterns in myocardial infarction. Relationship between the components identified by paper electrophoresis and in the ultracentrifuge. *Lancet* **2**, 910 (1957).
69. Strisower, B., Gofman, J. W., Galioni, E. F., Almada, A. A., and Simon, A.: Effect of thyroid extract on serum lipoproteins and serum cholesterol. *Metabolism* **3**, 218 (1954).
70. Strisower, B., Gofman, J. W., Galioni, E., Rubinger, J. H., O'Brien, G. W., and Simon, A.: Effect of long-term administration of desiccated thyroid on serum lipoprotein and cholesterol levels. *J. clin. Endocr.* **15**, 73 (1955).
71. Strisower, B., Gofman, J. W., Galioni, E. F., Rubinger, J. H., Pouteau, J. and Guzovich, P.: Longterm effect of dried thyroid on serum-lipoprotein and serum cholesterol levels. *Lancet* **272**, 120 (1957).

72. *Svedberg, T., und Pedersen, K. O.*: Die Ultrazentrifuge. Handbuch der Kolloidwissenschaften. Verlag Theodor Steinkopf, Dresden und Leipzig 1940.
73. *Svensson, H.*: Direkte photographische Aufnahme von Elektrophoresediagrammen. Kolloid Z. **87**, 181 (1939).
74. *Svensson, H.*: Theorie der Beobachtungsmethode der gekreuzten Spalte. Kolloid Z. **90**, 141 (1940).
75. *Swahn, B.*: Studies on blood lipids. Scand. J. clin. Lab. Invest. (Suppl. 9), vol. 5, 1953.
76. *Tamplin, A. R., Strisower, B., De Lalla, O. F., Gofman, J. W., and Glazier, F. W.*: Lipoproteins, aging and coronary artery disease. J. Geront. **9**, 404 (1954).
77. Technical Group, Committee on Lipoproteins and Atherosclerosis, National Advisory heart Council. Lipoproteins and ultracentrifugal technique. A symposium. 1952.
78. Technical Group of the Committee on Lipoproteins and Atherosclerosis and Committee on Lipoproteins and Atherosclerosis of the National Advisory Heart Council. Evaluation of serum lipoprotein and cholesterol measurements as predictors of clinical complications of atherosclerosis. Report of a cooperative study of lipoproteins and atherosclerosis. Circulation **14**, 691 (1956).
79. *Wiedemann, E.*: Eine neue Ultrazentrifuge und neue Laboratoriumszentrifugen. Chem. Ing. Technik **28**, 263 (1956).
80. *Wiedemann, E.*: Ein vereinfachtes optisches System zur Aufzeichnung von Brechungsindexgradienten bei Diffusions- und Sedimentationsmessungen. 4. Mitteilung über Laboratoriums- und Ultrazentrifugen. Helv. chim. Acta **40**, 1831 (1957).
81. *Wiedemann, E.*: Über die Aufzeichnung von Brechungsindexgradienten-Kurven ($\frac{dn}{dx}/x$ -Diagrammen) mittels einer neuartigen Phasenplatte. 10. Mitteilung über Elektrophorese. Helv. chim. Acta **40**, 2074 (1957).

